

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 JUL. 2004

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

Best Available Copy



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 540 • W / 210502

REMISE EN DÉPÔT DATE 16 JUL 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0308689 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 16 JUL. 2003		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 36, rue de St Pétersbourg 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) SG/ah-1708/1FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE BIOLOGIQUE DE DETOXICATION D'UN MILIEU LIQUIDE ALIMENTAIRE ET MILIEU LIQUIDE ALIMENTAIRE DETOXIFIE OBTENU SELON CE PROCEDE.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		REALDYME	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	"La Haute Epine"	
	Code postal et ville	12 18 7 0 0 GARANCIERES EN BEAUCE	
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2^{ème} page

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE EN DÉPÔT
DATE **16 JUIL 2003**
LIEU **75 INPI PARIS**
N° D'ENREGISTREMENT **0308689**
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 640 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)			
Nom		GOULARD	
Prénom		Sophie	
Cabinet ou Société		CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	36, rue de St Pétersbourg	
	Code postal et ville	75 008 PARIS	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00	
N° de télécopie (facultatif)		01.53.21.08.88	
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com	
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'Inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG [] [] [] []	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Sophie GOULARD N°02-0503		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. ROCHET	

La présente Invention est relative à un procédé biologique de décontamination des mycotoxines présentes dans un produit alimentaire liquide par adsorption de celles-ci sur des fibres végétales insolubles, à un procédé brassicole comportant au moins une étape de décontamination selon ce procédé, ainsi qu'aux
5 produits alimentaires au moins partiellement détoxifiés susceptibles d'être obtenus en mettant en œuvre un tel procédé.

L'importance de l'innocuité des aliments pour la sécurité alimentaire a été largement reconnue, en particulier par les divers gouvernements qui ont participé en 1992 à la Conférence Internationale sur la Nutrition ("*International Conference on*
10 *Nutrition*") qui s'est déroulée à Rome (Italie) et en 1996 au Sommet Mondial sur l'Alimentation ("*World Food Summit*") de Rome (Italie). La qualité et la sécurité des aliments peuvent être menacées par un grand nombre de facteurs, y compris par la présence de toxines naturelles.

En effet, parmi la longue liste de toxines pouvant naturellement se
15 retrouver dans les produits d'alimentation courante, les mycotoxines représentent une catégorie très importante qui figure parmi les plus étudiées dans la mesure où leur ubiquité et leurs effets néfastes sur la santé humaine et animale provoquent une inquiétude générale (FAO, 1999, "*Preventing Mycotoxin contamination*", Publication n°23, Rome, Italie, p 55).

20 Les produits agricoles sont les cibles potentielles de ravageurs et de maladies. Ils portent une flore microbienne variable et nombreuse comprenant principalement des bactéries, des levures et des champignons filamenteux. Leur présence peut notamment provoquer une détérioration de la qualité des produits agricoles, allant parfois jusqu'à leur destruction pure et simple.

25 Parmi ces microorganismes, les champignons filamenteux sont responsables de la production des mycotoxines, qui s'observe au cours de la croissance des produits agricoles dans les champs ou bien au cours de leur stockage dans des conditions propices d'humidité et de température. Les principaux genres de champignons (*fungi*) producteurs de mycotoxines sont *Penicillium*, *Fusarium*,
30 *Aspergillus* et *Alternaria*.

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de composition chimique très variable, mais en général de faible poids moléculaire. Leurs effets néfastes sur la santé humaine, qu'ils soient aigus ou chroniques, sont aussi très variés. Leurs cibles sont principalement les reins, le foie, le tractus gastro-intestinal et les systèmes nerveux et immunitaires. A ce jour, environ cinq cents mycotoxines ont été découvertes et leur nombre ne cesse d'augmenter au fur et à mesure que la recherche avance. Toutefois, seule une vingtaine sont bien identifiées comme une menace réelle pour la sécurité alimentaire. Parmi les différentes familles de mycotoxines rencontrées dans les produits alimentaires, on peut notamment citer les Aflatoxines (AFLA) composées des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂, l'Alternariol, la Fumonisine (FB), l'Ochratoxine A (OTA), la Patuline (PAT), les Trichotécènes dont la Vomitoxine, la Stérigmatocystine et la Zéaralénone (ZEA). En fonction de leur nature, ces mycotoxines peuvent avoir des effets néfastes divers sur la santé humaine ou animale ; elles peuvent notamment être hépato et immunotoxiques, carcinogènes, tératogènes, neurotoxiques, néphrotoxiques, ou bien encore entraîner des troubles digestifs ou des hémorragies.

Les principales denrées alimentaires susceptibles d'être contaminées par les mycotoxines sont les céréales, les noix, les fruits secs, le café, le cacao, les épices, les graines oléagineuses, les pois et les fèves, ainsi que les fruits. Leurs produits dérivés peuvent donc être contaminés, suivant la stabilité de la toxine au cours du processus de transformation. Il en résulte que ces mycotoxines, et notamment l'OTA, peuvent être transmises à de nombreux produits de consommation courante tels que le vin, la bière, le pain et les produits dérivés du café et du cacao (Abarca ML. *et al.*, J. Food Prot., 2001, 64(6), 903-906 ; Walker R., Adv. Exp. Med. Biol., 2002, 504, 249-255). Il existe également un risque non négligeable de contamination secondaire *via* différentes denrées d'origine animale telles que la viande, le lait, les œufs et les fromages (Pittet A., Revue Méd. Vét., 1998, 149, 479-492).

La contamination des produits alimentaires liquides préparés à partir de grains ou de fruits, par les mycotoxines est un sujet d'inquiétude croissant pour les industriels de l'agro-alimentaire et en particulier pour les brasseurs. En effet, l'amélioration des outils de détection et de quantification a permis de mettre en

lumière la présence de diverses mycotoxines dans la bière (voir notamment Scott P.M. *et al.*, Food Addit. Contam., 1995, 12(4), 591-598 ; Scott P.M., J AOAC Int., 1996, 79(4), 875-882) et Scott P.M. *et al.*, J AOAC Int., 1997, 80(6), 1229-34. Au cours du processus brassicole, une certaine dégradation des mycotoxines a lieu mais les données sont variables et lacunaires ; une disparition totale des toxines est rarement atteinte. La présence de mycotoxines, et en particulier d'OTA, dans la bière a été recensée dans de nombreuses études (voir notamment l'article de Nakajima M. *et al.*, J. AOAC Int., 1999, 82, 897-902). Les concentrations trouvées sont généralement faibles et souvent en dessous de la limite proposée de 0,2 µg d'OTA/l de bière.

10 Cependant, de fortes concentrations sont parfois détectées et une consommation assidue peut provoquer un dépassement de la dose journalière acceptable (DJA) (Stettner G., 2001, Nachweis und Verhalten von Deoxynivalenol und Ochratoxin A während der Bierbereitung. *Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II*, Technische Universität München, Deutschland). De plus, un certain nombre de gouvernements, de plus en plus conscients des problèmes liés aux mycotoxines, sont sur le point de légiférer à ce sujet.

Il existe par ailleurs un très grand nombre d'articles s'intéressant à ce problème au niveau planétaire parmi lesquels on peut notamment citer ceux de Wolf-Hall C.E. *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol., 2002, 504, 217-226 ; Tangni E.K. *et al.*, Food Add. Contam., 2002, 19(12), 1169-1179 et Odhav B. *et al.*, Food Add. Contam., 2002, 19(1), 55-61.

Les mycotoxines sont des composés très stables et résistants à la majorité des processus de transformation des produits agro-alimentaires. Par conséquent, et compte tenu de leurs effets néfastes sur la santé, il est de la plus grande importance de pouvoir disposer de moyens efficaces permettant :

- soit de prévenir la contamination des produits alimentaires,
- soit de les décontaminer avant et/ou après leur transformation.

La première approche n'est pas toujours réalisable compte tenu des conditions de culture ou de stockage des matières premières. La deuxième approche doit donc être mise en œuvre au niveau industriel et divers procédés physico-

chimiques ou biologiques ont déjà été proposés dans ce sens. Ces procédés de décontamination peuvent être classés en deux grandes catégories :

5 1) la première catégorie consiste à dégrader les toxines en des produits moins toxiques ou non toxiques afin que leur ingestion soit moins préjudiciable à l'organisme ;

2) la seconde catégorie consiste à utiliser des adsorbants afin de retenir, au moins en partie, les mycotoxines. Ces adsorbants sont soit utilisés au cours de la fabrication des produits alimentaires afin que les produits finis destinés à être consommés contiennent la plus faible quantité possible de mycotoxines résiduelles,
10 soit ajoutés aux aliments consommés pour en diminuer la biodisponibilité. Cette élimination est généralement réalisée au moyen de matériaux aptes à filtrer ou à adsorber les mycotoxines de façon à en diminuer la disponibilité.

Parmi les documents de l'art antérieur décrivant des procédés de filtration, on peut notamment citer le brevet américain US 5,248,382 qui décrit une
15 méthode pour réduire le taux de mycotoxines dans les jus de fruits, et en particulier le taux de patuline, au moyen d'une filtration sur une résine microporeuse capable de retenir la patuline par chémisorption et dans laquelle le diamètre des pores est inférieur à 20 Angström. Bien qu'efficace, cette méthode présente l'inconvénient de mettre en œuvre un matériel spécifique et coûteux.

20 Dans les nombreux documents de l'art antérieur décrivant des procédés appartenant à cette seconde catégorie, les mycotoxines sont éliminées par l'action d'adsorbants généralement inorganiques tels que les phyllosilicates comme les argiles et les aluminosilicates sodiocalciques hydratés (HCSAS), les charbons actifs et certains polymères spéciaux. Dans ce domaine, on peut notamment faire référence :

25 - à la demande de brevet allemand DE 3 810 004 concernant l'utilisation de bentonites ;

- à l'article de Arimoto-Kobayashi S *et al.*, Mutat. Res., 1997, 381(2), 243-249 divulguant la capacité détoxifiante d'un matériel mixte à base de chlorophylle, de polyglucosamine et de chitosan vis-à-vis de l'aflatoxine ;

- à la demande internationale WO 02/052950 concernant l'utilisation d'une poudre adsorbante à base de zéolite renfermant plus de 80 % d'un mélange de clinoptilote et d'heulandite et un composé ammonium quaternaire à chaîne grasse ; et

5 - à la demande internationale WO 02/40150 qui décrit l'utilisation de silicates lamellaires activés par de l'acide pour l'adsorption des mycotoxines.

Il existe aussi des méthodes mettant en œuvre des procédés de décontamination biologique. Dans ce domaine, on peut notamment citer la demande internationale WO 98/34503 qui décrit une méthode de traitement de produits biologiques contaminés par des mycotoxines dans laquelle le produit contaminé est
10 mis en contact avec des bactéries lactiques ou propioniques.

L'ensemble de ces procédés ne peut cependant pas toujours être utilisé pour la détoxification des produits alimentaires au niveau industriel dans la mesure où ils ne sont pas en totale adéquation avec les impératifs de coût, de conservation des propriétés de l'aliment et d'innocuité des produits de dégradation
15 générés au cours de ces procédés. Par ailleurs, les adsorbants actuellement disponibles sur le marché peuvent causer une certaine perte de nutriments au sein du produit alimentaire final ou bien leur mauvaise utilisation métabolique.

Il existe donc un réel besoin de mise au point d'un procédé de détoxification directement applicable aux produits alimentaires liquides issus de grains
20 ou de fruits notamment et en particulier au processus brassicole.

Les Inventeurs se sont donnés pour but de pourvoir à un procédé biologique de détoxification de milieux alimentaires liquides permettant de remédier à l'ensemble de ces inconvénients, et qui soit facilement et directement applicable à la détoxification de produits alimentaires et en particulier à la bière.

25 A cette occasion, les Inventeurs ont mis en évidence, de façon surprenante, que l'adsorption des mycotoxines sur des fibres végétales insolubles permet de décontaminer des milieux alimentaires liquides et par voie de conséquence d'éliminer de façon significative les mycotoxines susceptibles d'être présentes dans les produits alimentaires en dérivant.

30 Ce phénomène est à la base de la présente Invention.

La présente Invention a donc pour objet un procédé biologique de décontamination des mycotoxines dans un milieu alimentaire liquide, caractérisé par le fait qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

5 - l'adsorption d'au moins une partie des mycotoxines susceptibles d'être présentes dans le milieu alimentaire liquide à décontaminer par mise en contact dudit milieu avec des fibres végétales insolubles, et

- l'élimination desdites fibres sur lesquelles les mycotoxines sont adsorbées.

10 Le procédé biologique conforme à la présente Invention est basé sur l'effet adsorbant des fibres végétales insolubles vis-à-vis des mycotoxines. Il apporte une solution particulièrement efficace et facile à mettre en œuvre à moindre coût pour la décontamination en mycotoxines des produits alimentaires liquides et ce généralement sans modification majeure des procédés de fabrication habituellement utilisés. Il est en outre avantageusement directement utilisable au cours du processus
15 brassicole pour lequel il présente notamment l'avantage de faciliter l'étape de filtration et d'améliorer la stabilité de la mousse.

Selon une forme de réalisation avantageuse du procédé conforme à l'Invention, les fibres végétales insolubles sont choisies parmi les fibres issues :

20 - de végétaux alimentaires tels que les céréales, les légumineuses, les plantes potagères, les fruits y compris tropicaux, et plus généralement toute plante utilisée à des fins alimentaires,

- de végétaux utilisés par l'industrie du papier tels que les arbres, la canne à sucre, le bambou et la paille de céréale.

25 Parmi les fibres issues de céréales, on peut en particulier citer les fibres de blé, d'orge, d'avoine, de maïs, de millet, de riz, de seigle, de sorgho, et leurs équivalents maltés.

Selon l'invention, on entend par équivalent malté les grains germés dont la germination a été stoppée par un traitement thermique, puis débarrassés de leurs germes.

Parmi les fibres issues de végétaux alimentaires autres que les céréales, on peut notamment citer les fibres issues des pommes, des poires, des grains de raisins, des graines de lupin et de soja, des tomates, des pois, du café, etc.

Parmi les fibres de céréales, on préfère tout particulièrement :

- 5 - les isolats de fibres de blé vendus sous la dénomination commerciale Adfimax® 95, et en particulier l'Adfimax® 95 "y" ("cotonneux") et l'Adfimax® 95 "e" (fine) ;
- les fibres de blé micronisées vendues sous les dénominations commerciales Adfimax® 50 et Adfimax® BW ;
- 10 - les fibres d'orges micronisées vendues sous la dénomination commerciale Adfimax® 76, et en particulier l'Adfimax® 76 "e" et l'Adfimax® 76 "m" (medium) ;
- les fibres d'avoine vendues sous la dénomination commerciale Adfimax® 82 ;
- 15 - les fibres de pommes vendues sous la dénomination commerciale Adfimax® 75 ;
- les fibres de bambou vendues sous la dénomination commerciale Adfimax® 98 ;
- les fibres de pois vendues sous les dénominations commerciales
- 20 Adfimax® 90 et Adfimax® 56 ;
- les fibres de lupin vendues sous la dénomination commerciale Adfimax® 84 ; et
- les fibres de soja vendues sous la dénomination commerciale Adfimax® 80 ;
- 25 toutes ces fibres étant disponibles auprès de la société REALDYME (Garancières en Beauce, France) ;

 Selon une forme de réalisation avantageuse et astucieuse de l'Invention, la ou les fibres végétales utilisées sont choisies en fonction de la nature des milieux alimentaires liquides à décontaminer, c'est-à-dire parmi les fibres identiques à

30 celles entrant dans la composition de base des milieux à décontaminer. On pourra par exemple utiliser de préférence des fibres de pommes pour la décontamination des jus

de pommes ou bien des fibres d'orge pour la décontamination de la bière.

La nature des fibres utilisées conformément au procédé de l'Invention peut également être choisie en fonction de la nature de la ou des mycotoxines susceptibles d'être présentes dans le milieu alimentaire liquide à
5 décontaminer.

Ainsi, en ce qui concerne l'adsorption de l'OTA, on utilisera de préférence les produits Adfimax® 95, Adfimax® 82, Adfimax® BW, Adfimax® 75, ou leurs mélanges.

En ce qui concerne l'adsorption du déoxynivalénol (DON), on
10 utilisera de préférence l'Adfimax® 95, Adfimax® 98, Adfimax® 50, Adfimax® 90, ou leurs mélanges. En ce qui concerne la FB, on utilisera de préférence l'Adfimax® 82.

Selon une forme de réalisation particulièrement avantageuse du procédé conforme à l'Invention, les fibres végétales sont de préférence choisies parmi
15 les fibres micronisées. Les Inventeurs ont en effet constaté que l'utilisation de fibres végétales micronisées permettait de multiplier par deux environ la quantité de mycotoxines adsorbée par gramme de fibres par rapport à la quantité de mycotoxines adsorbées sur des fibres végétales non micronisées.

Selon cette forme de réalisation particulière, les fibres végétales se
20 présentent alors sous la forme de microparticules dont 90 % en poids présentent une taille inférieure à 100 µm, la granulométrie étant mesurée par tamisage sur un tamis A 200 LS Air Jet Sieve commercialisé par la société Alpine (Augsburg, Allemagne). De telles fibres peuvent notamment être préparées selon le procédé décrit dans la demande de brevet FR 2 433 910.

25 Selon l'Invention, on préfère tout particulièrement utiliser des fibres telles que l'Adfimax® BW, qui sont des fibres de blé micronisées sous forme de microparticules dont 67 % en poids présentent une taille inférieure à 75 µm.

Par ailleurs, et afin d'éviter toute absorption du milieu par les fibres lors de leur mise en contact avec le milieu alimentaire liquide à décontaminer, le
30 procédé conforme à l'Invention comprend en outre de préférence une étape préliminaire au cours de laquelle les fibres sont hydratées, de préférence à 100 %.

Cette hydratation préalable des fibres n'affecte pas de manière significative leur potentiel d'adsorption vis-à-vis des mycotoxines.

Selon le procédé conforme à l'Invention, la quantité de fibres végétales introduite dans le milieu liquide à décontaminer est de préférence comprise entre 0,5 et 20 % et encore plus préférentiellement entre 1 et 5 %, ces pourcentages étant exprimés en poids de fibres (avant hydratation éventuelle) par litre de milieu.

La mise en contact du milieu alimentaire avec les fibres végétales est de préférence réalisée pendant une durée pouvant varier entre quelques secondes et 90 minutes, plus préférentiellement entre 5 et 45 minutes. Les Inventeurs ont constaté que le phénomène d'adsorption se produit très rapidement et est irréversible à température constante au moins pendant 48 heures.

Le pH du milieu alimentaire liquide n'est pas critique selon l'Invention, cependant la mise en contact avec les fibres végétales est de préférence réalisée à un pH acide compris entre 1,5 et 7. Lorsque le procédé conforme à l'Invention est intégré à un processus brassicole, le pH du milieu alimentaire liquide est de préférence compris entre 5,2 et 5,4.

Par ailleurs, en ce qui concerne l'adsorption de l'OTA, les Inventeurs ont mis en évidence de façon surprenante que le pourcentage de mycotoxines retiré du milieu pour une quantité donnée de fibres végétales insolubles, et en particulier de fibres Adfimax® BW, est multiplié par deux environ lorsque le pH du milieu est compris entre 2 et 2,5.

Le pH du milieu peut naturellement être ajusté à la valeur désirée au moyen d'agents alcalinisants ou acidifiants tels que ceux habituellement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire.

La température du milieu à décontaminer peut également avoir une influence sur la quantité de mycotoxines adsorbée pour une quantité donnée de fibres, cette quantité ayant généralement tendance à diminuer au fur et à mesure que la température augmente. Ainsi, selon une forme de réalisation avantageuse du procédé conforme à l'Invention, le milieu est maintenu à une température comprise entre 7 et 80°C environ et de préférence entre 20 et 30°C environ pendant toute la durée de la mise en contact.

Parmi les différents milieux alimentaires liquides pouvant être décontaminés selon le procédé conforme à l'Invention, on peut notamment citer la bière, les mélanges de malt et d'eau et la maische des processus brassicoles, le vin, le café, les jus de fruits et le lait.

5 L'élimination des fibres à la fin de la période de mise en contact est de préférence réalisée par filtration selon les techniques connues et habituellement utilisées par l'Homme de l'art à cet effet.

Le procédé de décontamination conforme à l'Invention et tel qu'il vient d'être décrit ci-dessus présente l'avantage de pouvoir être directement intégré au processus brassicole sans qu'il ne soit nécessaire d'en modifier aucune des étapes.

Celui-ci fait intervenir principalement trois ingrédients qui sont le malt d'orge, l'eau et le houblon. La fabrication peut se faire de différentes manières bien connues de l'homme de l'art, mais on peut généralement distinguer quelques grandes étapes qui sont :

- 15 - le maltage qui comprend la germination des grains préalablement trempés,
- le brassage proprement dit qui représente la mise en solution des matières solubles du malt déjà partiellement dégradés par la germination et des grains crus, et qui conduit à l'obtention d'une maische,
- 20 - la filtration de la maische,
- l'ébullition : le filtrat (également dénommé moût), est ensuite porté à ébullition pendant des durées variables puis refroidi,
- la fermentation du moût et son inoculation au moyen de levures,
- la garde : c'est le temps de maturation de la bière variable selon les
- 25 bières,
- la filtration : après sa période de garde, la bière est à nouveau filtrée avant d'être soutirée et conditionnée.

Ainsi, l'Invention a donc également pour objet l'utilisation du procédé de décontamination en mycotoxines conforme à l'Invention pour la

30 détoxification de la bière au cours d'un processus brassicole, ledit procédé brassicole faisant intervenir au moins une opération de filtration.

Cette application particulière du procédé conforme à l'Invention permet non seulement de décontaminer la bière en mycotoxines mais présente les avantages supplémentaires :

- d'améliorer la qualité des filtrations, en particulier celle de la
5 maische, compte tenu de l'augmentation de la teneur en fibres dans le gâteau de filtration ;
- d'améliorer la stabilité de la mousse et
- de faciliter la clarification du moût au cours de la filtration et de la
10 clarification.

L'Invention a donc pour objet un procédé brassicole comprenant au
10 moins une étape de brassage et au moins une étape de fermentation d'un moût, caractérisé par le fait qu'il comporte en outre au moins une étape de décontamination en mycotoxines selon le procédé décrit précédemment, ladite étape de décontamination ayant lieu simultanément à l'étape de brassage et/ou après l'étape de
15 fermentation du moût.

Selon une première forme de réalisation de ce procédé, l'étape de décontamination est réalisée simultanément à l'étape de brassage, par mise en contact d'un mélange de malt moulu et d'eau avec des fibres végétales insolubles, de préférence hydratées, l'élimination desdites fibres sur lesquelles les mycotoxines sont
20 alors adsorbées étant réalisée par l'étape de filtration de la maische.

Dans ce cas, les fibres végétales sont de préférence introduites à raison de 1 à 20 % en poids environ par rapport au poids de malt.

Selon une deuxième forme de réalisation de ce procédé, l'étape de mise en contact du milieu liquide à décontaminer est réalisée après l'étape de
25 fermentation d'un moût par mise en contact du moût fermenté avec des fibres végétales insolubles, de préférence hydratées, l'élimination desdites fibres sur lesquelles les mycotoxines sont alors adsorbées étant réalisée par l'étape de filtration du moût fermenté (bière).

Dans ce cas, les fibres végétales sont de préférence introduites dans
30 le moût fermenté à raison de 0,5 à 10 % en poids environ par rapport au poids total du moût.

Enfin, l'Invention a pour objet les produits alimentaires au moins partiellement décontaminés en mycotoxines susceptibles d'être obtenus par la mise en œuvre du procédé de décontamination conforme à l'Invention et plus particulièrement les produits alimentaires liquides décontaminés tels que la bière et les jus de fruits, ainsi que les produits alimentaires solides décontaminés tels que les poudres lyophilisées comme par exemple le café, ou bien encore les produits laitiers tels que les yaourts et les fromages.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à un exemple de mise en évidence de la capacité d'adsorption d'OTA par des fibres végétales insolubles et criblage préliminaire de différentes fibres végétales, à un exemple de mise en évidence de l'adsorption d'OTA dans un moût brassicole, à un exemple d'étude de l'effet de la température sur l'adsorption d'OTA dans un milieu liquide modèle, et à une étude de l'impact de l'addition de fibres végétales insolubles sur le processus brassicole, à un exemple de mise en évidence de l'adsorption des aflatoxines totales par des fibres végétales insolubles dans un milieu liquide modèle, ainsi qu'aux figures 1 à 6 annexées dans lesquelles :

- la figure 1 représente l'évolution de l'adsorption d'OTA par cinq fibres différentes (Adfimax® 95 y ; Adfimax® 95 e ; Adfimax® BW ; Adfimax® 76 e et Adfimax® 76 m) en milieu liquide modèle contenant une concentration initiale de 30 ng d'OTA/ml pour un volume initial de 25 ml et une durée de la mise en contact de 45 minutes en fonction de la quantité de fibres en grammes par litre de milieu ;

- la figure 2 représente l'isotherme de Freundlich du log de la concentration en OTA adsorbée par unité d'Adfimax® BW en fonction du log de la concentration en OTA résiduelle dans le surnageant. Ceci permet d'estimer la capacité d'adsorption de l'OTA et l'affinité de l'Adfimax® BW à une température de 25°C ;

- la figure 3 représente la quantité d'OTA (ng) adsorbée par gramme de fibres Adfimax® BW en fonction de la concentration initiale du milieu en OTA en ng/ml ;

- la figure 4 représente l'effet de la température sur l'adsorption d'OTA ou le relargage d'OTA par des fibres Adfimax® BW ; sur cette figure, les

barres noires représentent l'adsorption d'OTA (en %) lors de la mise en contact directe, à différentes températures, des fibres avec le milieu contaminé et les barres grises représentent l'évolution de l'adsorption d'OTA (en %) sur des fibres préalablement mises en contact avec le milieu contaminé au cours de la montée en température (relargage) ;

- la figure 5 représente la quantité de filtrat récupérée (ml) en fonction du temps (minutes) pour différentes doses d'Adfimax® BW ajoutées à un mélange de malt et d'eau au cours d'un processus brassicole ;

- la figure 6 représente l'évolution de l'adsorption d'OTA (diminution de la quantité d'OTA en pourcentage de la quantité initialement présente) dans un milieu liquide modèle par des fibres Adfimax® BW en fonction des variations de pH.

EXEMPLE 1 : MISE EN EVIDENCE DE LA CAPACITE D'ADSORPTION D'OTA PAR DES FIBRES VEGETALES INSOLUBLES ET CRIBLAGE PRELIMINAIRE DE DIFFERENTES FIBRES VEGETALES

De façon surprenante, les Inventeurs ont mis en évidence que l'incorporation de fibres végétales dans un milieu liquide modèle permet, par l'adsorption de l'OTA sur les fibres, de diminuer la quantité de toxine disponible dans ce milieu. Les tests *in vitro* reportés dans cet exemple ont été réalisés afin de démontrer la capacité d'adsorption de fibres végétales micronisées lorsqu'elles sont incorporées dans un milieu liquide contaminé en OTA et afin de déterminer quel est le temps de mise en contact nécessaire à une adsorption optimale de l'OTA par ces fibres. Ensuite, un criblage de cinq fibres végétales différentes a été réalisé afin de déterminer quelles étaient les fibres les plus performantes vis-à-vis de l'adsorption de l'OTA. Chacune des fibres micronisées utilisées a été testée par rapport aux fibres non micronisées correspondantes.

1) Protocole expérimental

Une quantité déterminée de fibres végétales (environ 20 g/l) est mélangée dans un tube stérile de 50 ml avec 25 ml d'une solution aqueuse renfermant 2 % de Dextrose (vendu sous la dénomination commerciale D(+) glucose monohydraté par la société Merck), 5 % d'extrait de levures (vendu sous la dénomination commerciale Extrait de levures en Poudre par la société ICN

Biomedical) et 1 % de peptone (vendu sous la dénomination Peptone par la société Duchefa), préalablement stérilisée à 121°C pendant 15 minutes. Cette solution aqueuse présente un pH compris entre 6,0 et 6,2 et est dénommée "DYP" dans ce qui suit (milieu modèle). La solution DYP est ensuite contaminée par une quantité

5 variable d'une solution d'OTA dans l'éthanol. La concentration d'OTA dans le milieu liquide modèle est de 57 ng/ml. Le contenu du tube est ensuite homogénéisé par agitation manuelle pendant 30 secondes, puis le tube est placé à agiter à 90 tours par minute (tpm) dans une chambre thermostatée à 25°C pendant 45 minutes. Un traitement contrôle sans adsorbant (témoin), c'est-à-dire sans fibre végétale, est

10 effectué pour chaque expérience, et chacune de ces expériences est réalisée trois fois.

La suspension est ensuite centrifugée à 1830 g pendant 10 minutes à une température de 25°C puis le culot est séparé du surnageant. On extrait ensuite 1 ml de surnageant dans un tube stérile par 9 ml d'une solution de méthanol : eau (50 : 50 ; v/v). Le tube est ensuite vortexé pendant 30 secondes, puis centrifugé pendant 10

15 minutes à 820 g à une température comprise entre 5 et 10°C. Cet extrait est ensuite dilué, filtré et analysé par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Le système HPLC consiste en une pompe à régime isocratique Perkin Elmer® LC049 vendue par la société Norwalk (USA) avec une boucle d'injection de 50 µl vendue sous la dénomination Rheodyne® par la société Cotati

20 (USA), équipée d'une colonne C₁₈ d'une longueur de 150 mm et d'un diamètre de 4 mm vendue sous la dénomination Hypersil® BDS, d'une porosité de 3 µm, vendue par la société Tracer Analytica (Espagne), d'un détecteur à fluorescence RF 551 vendu par la société Shimadzu (Japon) muni d'une lampe xénon d'une puissance de 150 W réglé à une longueur d'onde d'excitation ($\lambda_{\text{excitation}}$) de 332 nm et à une longueur d'onde

25 d'émission ($\lambda_{\text{émission}}$) de 462 nm, d'un intégrateur SP4290 vendu par la société Spectra Physics (USA). La phase mobile est composée d'un mélange acétonitrile/eau/acide acétique (450/540/10 ; v/v) filtré sur membrane de 0,25 µm et dégazée à l'hélium pendant 15 minutes. Le débit de la phase liquide est fixé à 1 ml/mn à une pression comprise entre 2900 et 3000 psi.

30 La quantité d'OTA totale adsorbée est obtenue par différence entre la quantité initiale et finale présente dans le surnageant.

Dans cet exemple, les fibres suivantes ont été utilisées : Adfimax® 95 y, Adfimax® 95 e, Adfimax® BW, Adfimax® 76 e, et Adfimax® 76 m, et ce à différents dosages ;

2) Résultats

5 Les résultats obtenus sont reportés dans les tableaux I à IV ci-après ainsi que sur la figure 1 annexée.

Les pourcentages d'OTA adsorbées sur l'Adfimax® BW en fonction de la durée de la mise en contact, avec le milieu modèle contenant 57 µg/l d'OTA, à un pH compris entre 6,0 et 6,2 sont reportés dans le Tableau I ci-après :

10

TABLEAU I

	Quantité de mycotoxines adsorbée (%)		
	Durée de la période de mise en contact (heures)		
Quantité d'Adfimax® BW (g/l)	3	24	48
0 (Contrôle)	0	0	0
10	46,7	52,5	49,8
16	59,8	65,3	61,6
20	68,9	69,7	71,7
30	68,0	72,3	73,6

Ces résultats montrent que l'adsorption des fibres ne varie pas entre 3 et 24 heures. Par ailleurs, la quantité d'OTA adsorbée augmente en fonction de la quantité de fibres présentes dans le milieu.

15

Les effets de durées de mise en contact inférieures à 24 heures sur le taux d'adsorption d'OTA (en %) par les fibres (20 g de fibres Adfimax® BW par litre de milieu liquide modèle à pH 5,2 contenant 35 ng d'OTA/ml) sont reportés dans le Tableau II ci-après :

20

TABLEAU II

Durée de la mise en contact (en minutes)	% d'OTA adsorbé
0	0
5	21
15	20
45	25
90	29
169	28
360	30
1440	43

Ces résultats montrent que l'adsorption se produit très rapidement (entre 5 et 45 minutes environ) et que celle-ci se maintient au moins pendant toute la
 5 durée de l'expérience.

Les effets de la micronisation sur la capacité d'adsorption des fibres Adfimax® BW et de leur matière première non-micronisée sont reportés dans le Tableau III ci-après :

TABLEAU III

Quantité de fibres (g/l)	Quantité d'OTA adsorbée (%)	
	Matière première non micronisées	Adfimax® BW
20	17 %	33 %
30	22 %	37 %

10

Ces résultats montrent que la micronisation permet d'améliorer la capacité d'adsorption des fibres d'un facteur proche de deux.

La figure 1 annexée représente la capacité d'adsorption de cinq fibres différentes (Adfimax® 95 y : triangles pleins ; Adfimax® 95 e : carrés pleins ;
 15 Adfimax® BW : croix ; Adfimax® 76 e : ronds pleins et Adfimax® 76 m : triangles vides) en milieu DYP contenant une concentration initiale de 30 ng d'OTA/ml pour un volume initial de 25 ml et une durée de mise en contact de 45 minutes. Sur cette

figure, le pourcentage d'OTA résiduelle est exprimé, pour chaque fibre, en fonction de la quantité de fibres en grammes par litre de milieu DYP.

Les résultats représentés sur la figure 1 montrent que même à des concentrations aussi faibles que 5 g de fibres par litre de milieu, on observe une bonne adsorption de l'OTA, en particulier avec l'Adfimax® 95 y.

EXEMPLE 2 : MISE EN EVIDENCE DE L'ADSORPTION DE L'OTA DANS UN MOUT BRASSICOLE

Une quantité déterminée de fibres Adfimax® BW (20 g/l) est mélangée avec 47 ml de mout clarifié contaminé par 1,5 µg d'OTA/l. Le contenu du tube est ensuite homogénéisé par agitation manuelle pendant 30 secondes, puis le tube est placé à agiter à 90 tours par minute (tpm) dans une chambre thermostatée à 25°C pendant 45 minutes. Un traitement contrôle sans adsorbant (témoin), c'est-à-dire sans fibre végétale, est également réalisé pour chaque expérience afin de vérifier l'éventuelle disparition spontanée d'OTA. Chaque essai a été réalisé en triple.

La suspension est ensuite centrifugée à 1830 g pendant 10 minutes à une température de 25°C puis le culot est séparé du surnageant et extrait de la façon suivante : 20 ml de surnageant est dilué avec 2,5 ml d'eau contenant 4 % en poids de bicarbonate de sodium et 7,5 ml de tampon phosphate (PBS). Le mélange est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 820 g à une température comprise entre 5 et 10°C. 22,5 ml du surnageant est ensuite injecté dans une colonne d'immunoaffinité vendue sous la dénomination OchraTest® par la société Vicam à raison de 1 à 2 ml/min, ladite colonne ayant préalablement été conditionnée par 20 ml d'une solution de PBS. La colonne est ensuite rincée par 10 ml d'eau puis éluée au méthanol (2 ml) puis à l'eau (2 ml). 20 ml d'air atmosphérique sont ensuite passés sur la colonne pour collecter tout l'éluat qui est ensuite filtré sur un filtre dont le diamètre des pores est de 0,45 µm puis analysé par HPLC selon le protocole décrit ci-dessus à l'exemple 1.

Les valeurs d'adsorption sont ensuite comparées à l'isotherme empirique de Freundlich qui est donné par l'équation (I) suivante :

$$C_a = k \cdot C_f^n \quad (I)$$

- C_a est la quantité d'OTA adsorbée par unité de poids d'adsorbant ($\mu\text{g/g}$) ;

- C_r est la concentration d'OTA non adsorbée à l'équilibre ($\mu\text{g/ml}$) ;

- k est une constante relative à la capacité d'adsorption de l'adsorbant

5 pour l'OTA et

- n est une constante relative à l'affinité de l'adsorbant pour l'OTA.

Les courbes de régression linéaire ont été calculées entre les valeurs logarithmiques de C_a et de C_r et un coefficient de corrélation R^2 a été utilisé pour vérifier la validité de la courbe.

10 Afin d'évaluer la cinétique du phénomène d'adsorption observé, une expérience est menée au cours de laquelle une quantité de fibres correspondant à une proportion de 11 g/l est mise en contact avec du moût préalablement contaminé à des doses croissantes d'OTA (de 0 à 2,5 ng/ml). L'analyse de l'adsorption de l'OTA est effectuée comme décrit ci-dessus.

15 2) Résultats

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau IV ci-après ainsi que sur les figures 2 et 3 annexées.

20 La figure 2 représente l'isotherme de Freundlich du log de la concentration en OTA adsorbée par unité d'Adfimax® BW en fonction du log de la concentration en OTA résiduelle dans le surnageant. Ceci permet d'estimer la capacité d'adsorption de l'OTA et l'affinité de l'Adfimax® BW à une température de 25°C.

La figure 3 représente la quantité d'OTA (ng) adsorbée par gramme de fibres Adfimax® BW en fonction de la concentration initiale du milieu en OTA en ng/ml.

25

TABLEAU IV

Quantité de fibres (g/l)	Quantité d'OTA adsorbée (%)
1	6 ± 3
5	12 ± 3
15	22 ± 3
20	28 ± 2
30	35 ± 2
40	41 ± 4

Ces résultats montrent que les fibres Adfimax® BW sont capables d'adsorber l'OTA dans le moût brassicole. Ils montrent également que la quantité d'OTA adsorbée augmente avec la quantité de fibres présente dans le moût brassicole. Par ailleurs, le modèle empirique de Freundlich représenté sur la figure 2 correspond aux valeurs expérimentales de l'adsorption d'OTA par les fibres Adfimax® BW avec un coefficient de relation R^2 de 0,8786. La capacité d'adsorption des fibres, calculée par la constante d'adsorption de Freundlich, était de 29,5 mg d'OTA/g de fibres et la constante d'affinité de 2,08 ml/g de fibres.

Enfin, les résultats représentés sur la figure 3 montrent que la relation entre la quantité d'OTA adsorbée par gramme de fibres et la quantité d'OTA initialement présente dans le milieu à décontaminer est linéaire.

A titre comparatif, les phyllosilicates, les terres de diatomées, la bentonite, l'aluminosilicate HSCAS et la cholétéramine, connus pour leur propriété adsorbantes vis-à-vis des mycotoxines et testés dans les mêmes conditions ont respectivement donné les capacités d'adsorption suivantes : 0,3 à 0,44 ; 0,5 à 1,5 ; 1,5-9,0 ; 2,2 et 9,6 mg/g. Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues avec les fibres Adfimax ® BW.

EXEMPLE 3 : EFFET DE LA TEMPERATURE SUR L'ADSORPTION D'OTA DANS UN MILIEU LIQUIDE MODELE

Selon le procédé conforme à l'invention, et tel que décrit précédemment, il a été indiqué que la décontamination de la bière au moyen de fibres végétales insolubles peut être réalisée sans modification du processus brassicole et en

particulier simultanément à l'étape de brassage, lors du mélange du malt moulu et de l'eau. Etant donné que ce mélange est ensuite porté à des températures allant jusqu'à 78°C, il est important de démontrer que l'adsorption a bien lieu à de telles températures et d'évaluer le relargage des mycotoxines adsorbées qui aurait lieu lors
 5 de la montée en température.

1) Protocole expérimental

Le milieu modèle synthétique DYP contaminé est préalablement traité de la même manière que dans l'exemple 1 ci-dessus.

Afin d'étudier l'effet de la température sur l'adsorption de l'OTA par
 10 les fibres, le milieu DYP contaminé est porté à des températures de 12, 25, 63 et 72 °C pendant 10 à 15 minutes avant l'introduction des fibres Adfimax® BW. Une mise en contact de 45 minutes est ensuite réalisée à chacune de ces températures dans un bain-marie thermostaté. A chaque température, l'OTA adsorbée sur les fibres est quantifiée.

Parallèlement, et afin d'étudier un éventuel relargage des
 15 mycotoxines déjà adsorbées sur des fibres, au cours d'une montée en température ultérieure l'adsorption, des fibres végétales insolubles sont d'abord mises en contact avec le milieu DYP contaminé à une température de 13 °C. Les tubes contenant le mélange sont ensuite portés successivement à des températures de 25, 63 et 72 °C, avec une période de mise en contact de 45 minutes à chacune de ces températures. A
 20 chaque palier de température, l'OTA adsorbée sur les fibres est quantifiée.

Pour chaque expérience, la séparation, l'extraction, la purification et l'analyse de la quantité d'OTA sont effectuées selon le protocole décrit ci-dessus à l'exemple 1.

2) Résultats

25 Les résultats obtenus, c'est-à-dire l'effet de la température sur l'adsorption d'OTA ou le relargage d'OTA par des fibres Adfimax® BW, sont représentés sur la figure 4 annexée.

Sur cette figure, les barres noires représentent l'adsorption d'OTA (en %) lors de la mise en contact directe des fibres avec le milieu contaminé et ce à
 30 chacune des températures testées (adsorption directe) et les barres grises représentent

l'évolution de l'adsorption d'OTA (en %) sur les fibres préalablement mises en contact avec le milieu contaminés au cours de la montée en température (relargage).

On remarque que l'effet de la température est similaire dans les deux conditions (adsorption directe et relargage). Une hausse de température provoque une diminution de l'adsorption de l'OTA sur les fibres (adsorption directe) ou un relargage des toxines déjà adsorbées. Dans le cas de l'adsorption directe, une relation linéaire peut être établie entre la température et le pourcentage de diminution de l'OTA dans le milieu.

EXEMPLE IV : ETUDE DE L'IMPACT DE L'ADDITION DE FIBRES VEGETALES INSOLUBLES SUR LE PROCESSUS BRASSICOLE

1) Protocole expérimental

100 grammes de malt sont pesés dans un cylindre dont la tare est connue et y sont mélangés avec 350 ml d'eau "osmose inverse" (OI) à 63°C. Dans différents cylindres sont ajoutés différentes quantités de fibres Adfimax® BW préalablement saturées en OI, afin d'y obtenir les proportions de 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 15 % de fibres. Le contenu des cylindres est ensuite soigneusement mélangé puis les cylindres sont insérés dans un bain-marie thermostaté à 63°C, chacun étant surmonté d'un agitateur. Le diagramme de température est le suivant : 30 minutes à 63°C, 20 minutes à 72°C et 1 minute à 78°C. Les cylindres sont ensuite retirés du bain-marie, rapidement séchés et pesés, puis leur contenu est passé sur un filtre en cellulose reposant sur un pied gradué de 500 ml. Le volume du filtrat est noté suivant le temps.

Lorsque la filtration est achevée, on mesure la densité de chaque moût ainsi obtenu, ce qui permet de calculer le rendement d'extrait (pourcentage des matières solubles contenues dans les grains effectivement mises en solution dans le moût) ainsi que sa couleur sur l'échelle élaborée à cet effet par la "European Brewing Convention" (EBC).

Afin de mesurer la fermentabilité (atténuation limite), 100 ml de moût sont alors prélevés et mélangés stérilement dans une bouteille avec 20 ml d'une suspension de levures de brasserie.

Dans cet exemple, chaque expérience est réalisée deux fois et des mesures identiques sont également effectuées sur un mout n'ayant pas été mis en contact avec des fibres afin de servir de contrôle.

2) Résultats

5 Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau V ci-après :

TABLEAU V

Quantité de fibres (% en poids)	Densité (g/100 g)	Rendement d'extrait (%)	Couleur (EBC)	Atténuation limite (%)
0 (Contrôle)	18,9	74,72	12	86,67
0,5	18,7	74,92	12	86,63
1	18,2	74,53	12	86,26
2	18,2	74,76	12	85,27
5	17,7	76,61	13	86,72
10	17,9	78,57	14	87,93
15	17,1	81,35	14,5	85,50

La figure 5 annexée représente la quantité de filtrat récupérée en ml en fonction du temps en minutes pour les différentes doses de fibres ajoutées (Contrôle (0 %) : carrés pleins ; 0,5 % : losanges vides ; 1 % : triangles pleins ; 2 % : losanges vides ; 5 % : ronds vides ; 10 % : ronds pleins ; 15 % carrés vides).

Ces résultats montrent que la filtration est aussi grandement avantagée par l'addition de fibres. Par ailleurs, il est important de remarquer que l'intégration du procédé de décontamination conforme à la présente Invention dans un processus brassicole n'a aucune influence négative sur son déroulement et en particulier sur la fermentabilité (atténuation limite).

EXEMPLE V : ETUDE DE L'EFFET DU pH SUR L'ADSORPTION DES MYCOTOXINES PAR DES FIBRES DE BLE

Le pH du milieu est susceptible d'influencer l'adsorption de l'OTA sur les fibres car il influence la répartition des charges électriques sur les fibres, sur les toxines et dans le milieu. Au cours du processus brassicole, d'ailleurs, le pH du milieu liquide passe de 5,2 pour le moût à environ 4 pour la bière.

Afin d'étudier l'impact du pH, une expérience en milieu modèle a été réalisée, consistant en la mesure de l'adsorption avant et après une descente puis une remontée du pH.

1) Protocole expérimental :

Une quantité connue de fibres Adfimax® BW correspondant à la concentration de 20 g de fibres/l est mélangée dans un tube stérile de 50 ml à 25 ml de milieu modèle DYP tel que décrit ci-dessus à l'exemple 1, préalablement contaminé à 50 ng d'OTA/ml au moyen d'une solution d'OTA dans de l'éthanol. Le pH du milieu est mesuré à 6.

Le contenu du tube est alors incubé, séparé, extrait, purifié et analysé comme décrit ci-dessus à l'exemple 1.

Parallèlement, le pH de ce même DYP est, dans deux autres tubes déjà garnis de fibres, abaissé jusqu'à une valeur de 2,2 par ajout d'acide lactique solide. Le contenu d'un des deux tubes est alors incubé, séparé, extrait, purifié et analysé comme décrit ci-dessus à l'exemple 1.

Le pH du milieu dans le deuxième tube est alors remonté à 4,8 par ajout de granules d'hydroxyde de sodium. Le contenu du tube est alors incubé, séparé, extrait, purifié et analysé comme dans l'exemple 1.

Chaque expérience est effectuée trois fois.

2) Résultats :

Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 6 annexée qui représente l'évolution de l'adsorption de l'OTA (diminution de la quantité d'OTA dans le milieu DYP en % de la quantité initialement présente) sur les fibres après la descente et après la remontée du pH dans le milieu DYP. Sur cette figure, la barre noire correspond aux mesures effectuées à pH 6, la barre hachurée aux mesures effectuées à pH 2,2 et la barre blanche aux mesures effectuées après remontée du pH de 2,2 à 4,8.

Il est manifeste que plus le pH est bas, plus l'adsorption de l'OTA par les fibres est forte, atteignant même pour un pH de 2,2 un pourcentage d'adsorption de 82,4 %. Le relargage de la toxine lors de la remontée du pH ne semble pas être aussi fort que l'augmentation de l'adsorption lors de l'abaissement du pH.

La diminution du pH permet donc, pour une même quantité de fibres, d'augmenter de façon considérable la quantité d'OTA adsorbée par ces fibres.

EXEMPLE VI : MISE EN EVIDENCE DE L'ADSORPTION DE L'OTA SUR DES FIBRES VEGETALES DANS DU JUS DE RAISIN.

1) Protocole expérimental :

Une quantité pesée de fibres Adfimax® BW est mélangée à 25 ml de jus de raisin acheté dans le commerce et préalablement contaminé à raison de 400 ng d'OTA/l de jus de raisin, au moyen de moût naturellement contaminé par de l'OTA. Le poids de fibres est calculé afin de correspondre aux concentrations de 20 et 50 g de fibres/l de jus de raisin.

Les tubes sont ensuite mélangés, purifiés, extraits et analysés par HPLC comme décrit ci-dessus à l'exemple 1.

Un traitement contrôle (sans fibre) est mené parallèlement et chacun des traitements est effectuée trois fois.

2) Résultats

Les résultats concernant la diminution de la quantité d'OTA contenue dans le jus de raisin suivant la dose de fibres ajoutée sont reportés dans le tableau VI ci-après :

TABLEAU VI

Dose de fibre (g/l)	Pourcentage d'adsorption
20	74 ± 1,8 %
50	84,8 ± 2,4 %

Ces résultats montrent que la mise en contact de jus de raisin avec ces fibres conduit à une bonne diminution de la concentration en OTA. Le pourcentage d'adsorption est très élevé, cela pouvant être attribué en partie à l'acidité du jus de raisin.

EXEMPLE VII : MISE EN EVIDENCE DE L'ADSORPTION DES AFLATOXINES TOTALES (B1 + B2 + G1 + G2) PAR DES FIBRES VEGETALES INSOLUBLES

5 Une quantité déterminée de fibres végétales (Adfimax® BW : 20 g/l) est introduite dans un tube stérile de 50 ml et mélangée avec une solution de DYP (25 ml) telle que décrite ci-dessus à l'exemple 1, préalablement contaminée par les aflatoxines totales (720 ng/l). Après homogénéisation manuelle pendant 30 secondes, le tube est placé à agiter à 90 tours par minutes dans une chambre thermostatée à 25°C pendant 45 minutes. Un traitement contrôle sans adsorbant a servi de témoin.

10 A l'échéance, la suspension est ensuite centrifugée à 1830g pendant 10 minutes à 25°C, puis le culot est séparé du surnageant. L'essai est réalisé trois fois.

Les aflatoxines totales (initiales et résiduelles) sont analysées par une méthode immunochimique ELISA de compétition directe à l'aide du test spécifique quantitatif à haute sensibilité vendu sous la dénomination commerciale
15 Veratox® HS par la société Neogen Corporation (USA). Le protocole préconisé par le fournisseur de ce test a été utilisé.

Ce test immunochimique (ELISA) a été réalisé de manière suivante :

- dépôt de 100 µl de conjugué dans chaque micropuits non tapissé d'anticorps ;
- 20 - ajout de 100 µl de standard ou de 100 µl d'échantillon et mélange ;
- prélèvement de tout le mélange et son dépôt dans un micropuits tapissé d'anticorps ;
- incubation pendant 10 minutes à température ambiante ;
- lavage cinq fois avec de l'eau désionisée ;
- 25 - dépôt de 100 µl de substrat ;
- incubation pendant 10 minutes à la température ambiante ;
- ajout de 100 µl de solution "Red Stop" fournie avec le test pour arrêter la réaction substrat-enzyme.

30 En parallèle, on réalise une courbe d'étalonnage avec un standard (0 à 1,6 ng d'aflatoxines /ml).

La densité optique des colorations est ensuite lue à une longueur d'onde de 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque vendu sous la dénomination commerciale Labsystem Multiscan MCC/340-RS232C (Labsystems, Finlande).

5 La limite de détection et la limite de quantification de cette méthode analytique sont respectivement estimées à 3 et 10 ppt alors que le pourcentage de récupération est de 100 %

10 Le résultat de cet essai révèle une diminution des aflatoxines totales due à leur adsorption sur l'Adfimax BW (2 %) de l'ordre de $33,3 \pm 5,8$ % ($n = 3$) pour une contamination initiale de 720 ng/l contenue dans le milieu synthétique (DYP) à pH=6,0.

REVENDICATIONS

1. Procédé biologique de décontamination des mycotoxines dans un milieu alimentaire liquide, caractérisé par le fait qu'il comprend au moins les étapes
5 suivantes :

- l'adsorption d'au moins une partie des mycotoxines susceptibles d'être présentes dans le milieu alimentaire liquide à décontaminer par mise en contact dudit milieu avec des fibres végétales insolubles, et

10 - l'élimination desdites fibres sur lesquelles les mycotoxines sont adsorbées.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que les fibres végétales insolubles sont des fibres issues :

- de végétaux alimentaires choisis parmi les céréales, les légumineuses, les plantes potagères, et les fruits y compris tropicaux ;

15 - de végétaux issus de l'industrie du papier choisis parmi les arbres, la canne à sucre, le bambou et la paille de céréales.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que les fibres issues de végétaux alimentaires sont des fibres issues de céréales et sont choisies parmi les fibres de blé, d'orge, d'avoine, de maïs, de millet, de riz, de seigle,
20 de sorgho, et leurs équivalents maltés.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que les fibres végétales insolubles sont choisies parmi les fibres issues des pommes, des poires, des grains de raisins, des graines de lupin et de soja, des tomates, des pois et du café.

25 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que les fibres sont choisies parmi les fibres micronisées.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisée par le fait que les fibres se présentent sous la forme de microparticules dont 90 % en poids présentent une taille inférieure à 100 µm.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il comprend en outre une étape préliminaire au cours de laquelle les fibres sont hydratées.

5 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que la quantité de fibres végétales introduite dans le milieu liquide à décontaminer est comprise entre 0,5 et 20 % en poids par litre de milieu.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que la mise en contact du milieu alimentaire avec les fibres végétales est réalisée pendant une durée comprise entre quelques secondes et 90
10 minutes.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que la mise en contact du milieu alimentaire avec les fibres végétales est réalisée à un pH compris entre 1,5 et 7.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le milieu est maintenu à une température comprise entre 7 et 80°C pendant toute la durée de la mise en contact.
15

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le milieu est choisi parmi la bière, les mélanges de malt et d'eau et la maische des processus brassicoles, le vin, le café, les jus de fruits et le lait.

20 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'élimination des fibres à la fin de la période de mise en contact est réalisée par filtration.

14. Utilisation du procédé tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 13, pour la détoxication de la bière au cours d'un processus
25 brassicole, ledit procédé brassicole faisant intervenir au moins une opération de filtration.

15. Procédé brassicole comprenant au moins une étape de brassage et au moins une étape de fermentation d'un moût, caractérisé par le fait qu'il comporte en outre au moins une étape de décontamination en mycotoxines selon le procédé tel
30 que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 13, ladite étape de décontamination ayant lieu simultanément à l'étape de brassage et/ou après l'étape de

fermentation du moût.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé par le fait que l'étape de décontamination est réalisée simultanément à l'étape de brassage, par mise en contact d'un mélange de malt moulu et d'eau avec des fibres végétales insolubles, l'élimination desdites fibres sur lesquelles les mycotoxines sont alors adsorbées étant
5 réalisée par l'étape de filtration de la maische à la fin du brassage.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé par le fait que les fibres végétales sont introduites à raison de 1 à 20 % en poids par rapport au poids de malt.

10 18. Procédé selon la revendication 15, caractérisé par le fait que l'étape de mise en contact du milieu liquide à décontaminer est réalisée après l'étape de fermentation d'un moût par mise en contact du moût fermenté avec des fibres végétales insolubles, l'élimination desdites fibres sur lesquelles les mycotoxines sont alors adsorbées étant réalisée par l'étape de filtration du moût fermenté.

15 19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé par le fait que les fibres végétales sont introduites dans le moût fermenté à raison de 0,5 à 10 % en poids par rapport au poids total du moût.

20 20. Produits alimentaires au moins partiellement décontaminés en mycotoxines, caractérisés par le fait qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par la mise en œuvre du procédé de décontamination tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 13.

21. Bière au moins partiellement décontaminée en mycotoxines, caractérisée par le fait qu'elle est susceptible d'être obtenue par la mise en œuvre du procédé brassicole tel que défini à l'une quelconque des revendications 15 à 19.

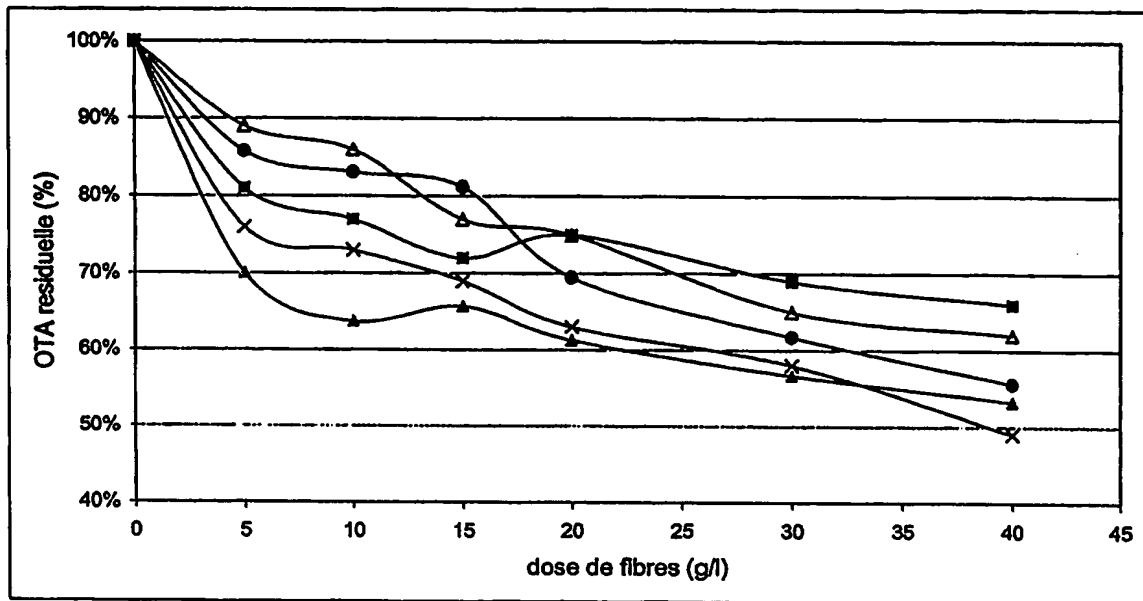


FIGURE 1

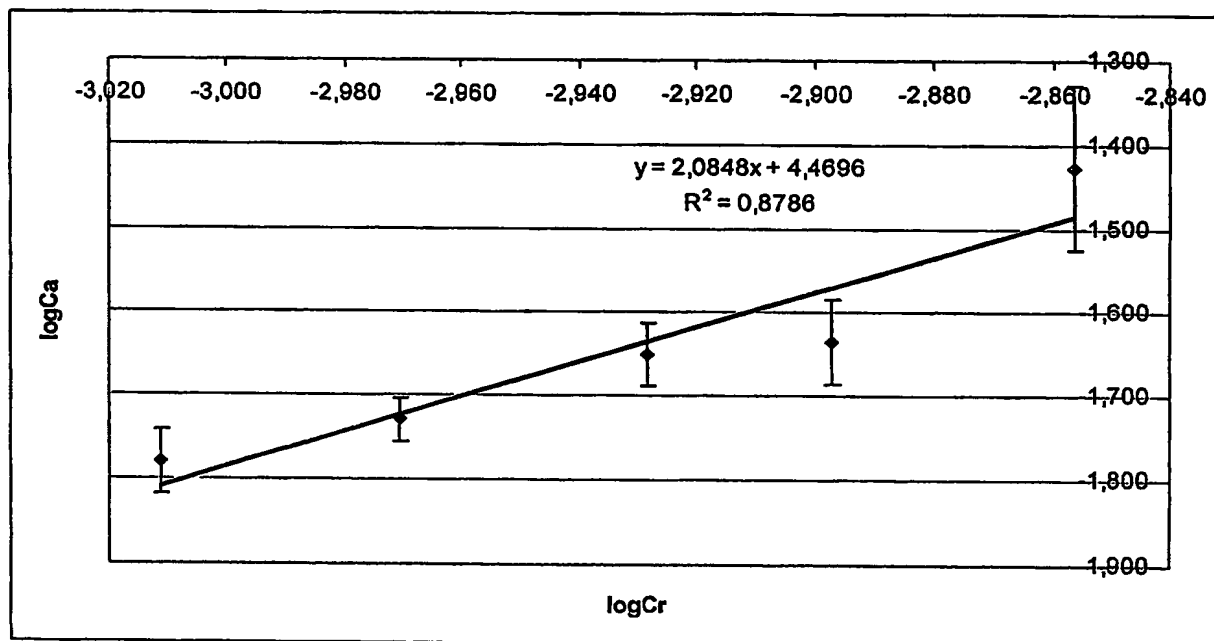


FIGURE 2

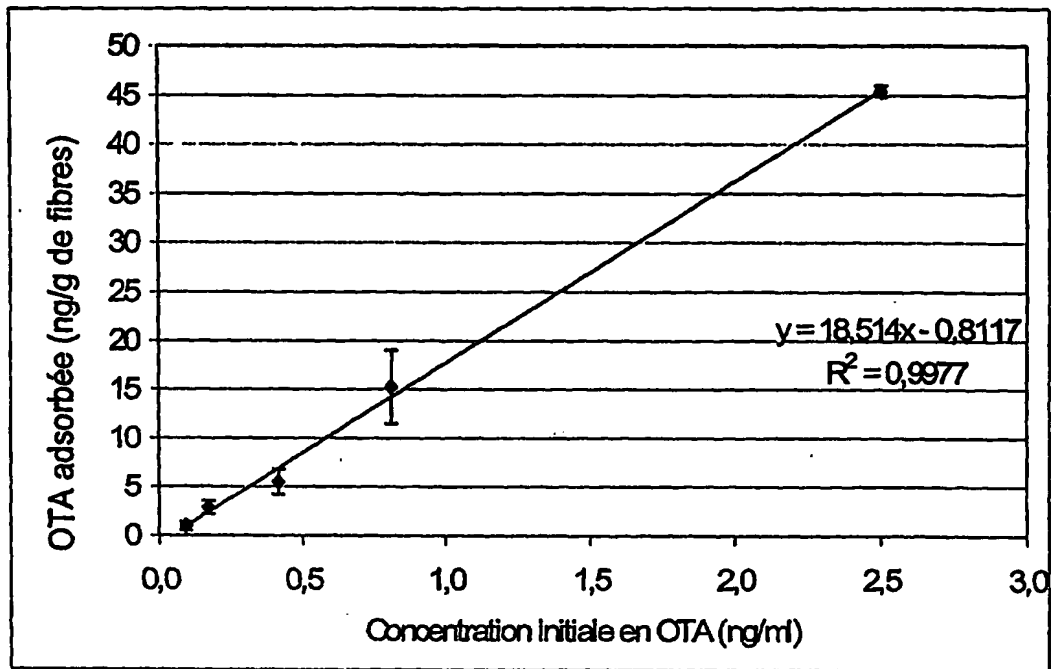


FIGURE 3

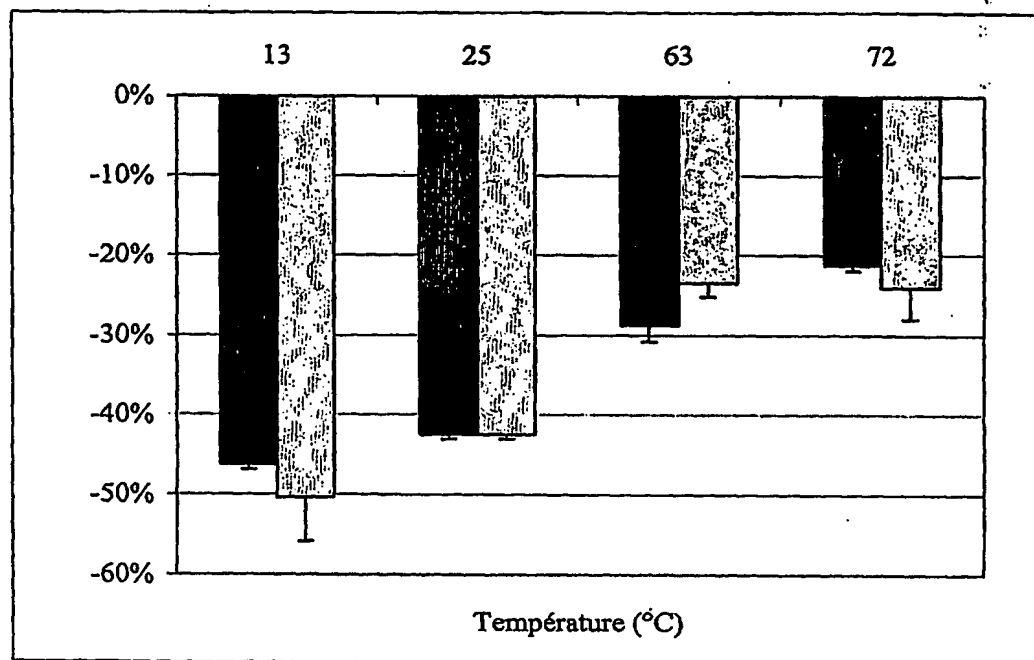


FIGURE 4

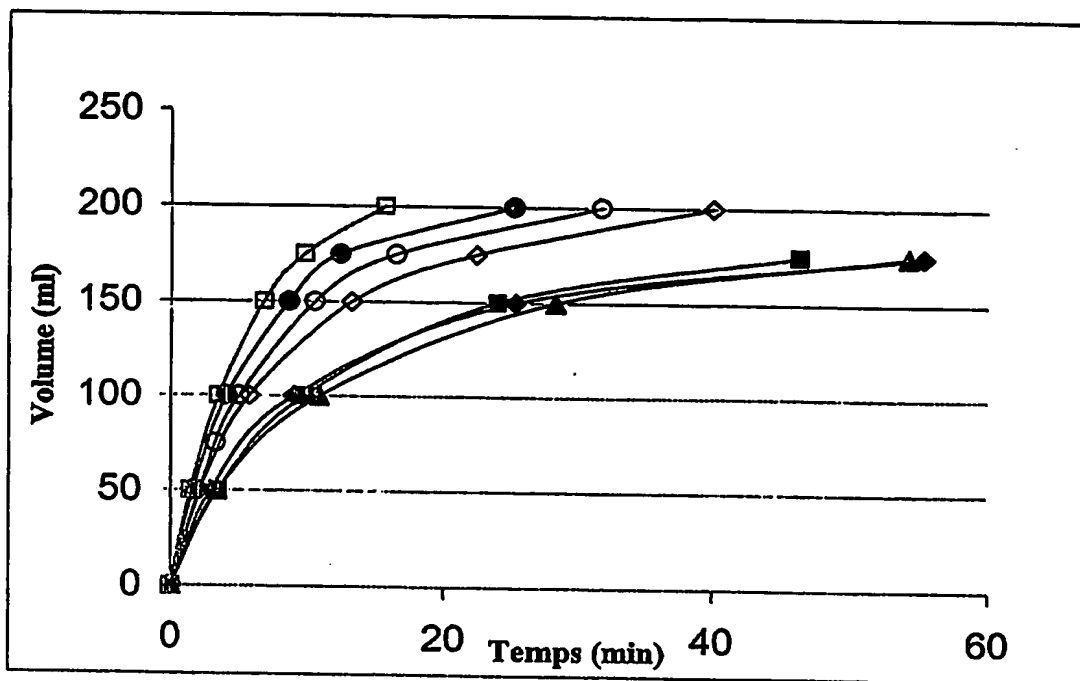


FIGURE 5

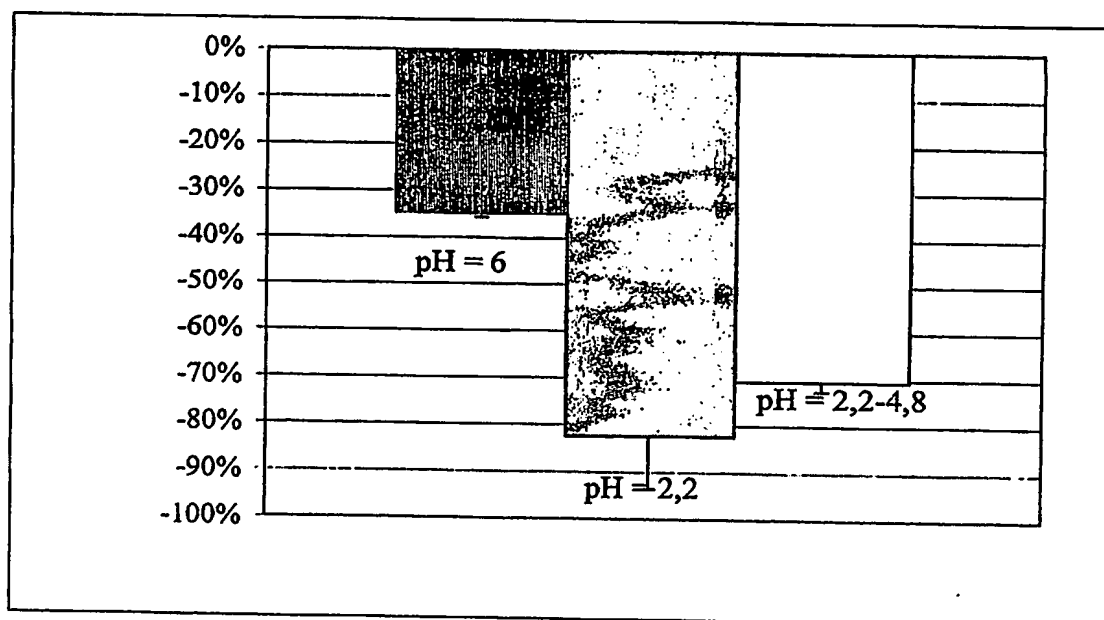


FIGURE 6



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

► N° Indirpo 0 825 83 85 87
0,18 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 0 W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		SGstsF1708/1ER
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03 08689
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PROCÉDE BIOLOGIQUE DE DETOXICATION D'UN MILIEU LIQUIDE ALIMENTAIRE ET MILIEU LIQUIDE ALIMENTAIRE DÉTOXIFIÉ OBTENU SELON CE PROCÉDE		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
REALDYME		
DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	TANGNI
	Prénoms	Emmanuel Kossi
Adresse	Rue	27/202 rue Charles de Loupaigne
	Code postal et ville	1113148 LOUVAIN-LA-NEUVE (Belgique)
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	SIMONIS
	Prénoms	Julien
Adresse	Rue	85 avenue J.F. Debecker
	Code postal et ville	11121010 BRUXELLES (Belgique)
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	LARONDELLE
	Prénoms	Yvan
Adresse	Rue	67 avenue du Suffrage Universel
	Code postal et ville	11101310 BRUXELLES (Belgique)
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 6 juillet 2004 GOULARD Sophie 02-0503		



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous Informer : INPI DIRECT

☎ N° Indirect 0 825 83 85 87
0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 113 ● W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		SGsIsF1708/1FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03 08689
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PROCEDE BIOLOGIQUE DE DETOXICATION D'UN MILIEU LIQUIDE ALIMENTAIRE ET MILIEU LIQUIDE ALIMENTAIRE DETOXIFIE OBTENU SELON CE PROCEDE		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
REALDYME		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		de MEEÛS d'ARGENTEUIL
Prénoms		Ludovic
Adresse	Rue	Ferme de Géronvilliers
	Code postal et ville	11450 CHASTRE (Belgique)
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S)		
DU (DES) DEMANDEUR(S)		Paris, le 6 juillet 2004
OU DU MANDATAIRE		
(Nom et qualité du signataire)		
GOULARD Sophie		
02-0503		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.